

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月22日提出

対象研究テーマ：肺がんの分子標的薬耐性機構の解明とその克服に関する研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：骨転移能を有する癌細胞と骨芽細胞の接触による相互作用の検討

研究代表者：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授 上原久典

研究成果の概要：

骨芽細胞は骨に転移した癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしている。癌細胞と骨芽細胞の相互作用に関しては多くの報告があるが、大部分は両者が分泌する液性因子を介したものであり、癌細胞と骨芽細胞が直接接触することによって起きる相互作用に関しては不明な点が多い。我々はこれまでに溶骨性増殖を示す前立腺癌細胞と骨芽細胞が接触することによって破骨細胞誘導が促進されることを明らかにしてきたが、今回は前立腺癌細胞と骨芽細胞の接触による骨芽細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析した。その結果、不死化したヒト骨芽細胞が PC-3 ヒト前立腺癌細胞と接触することによって脂肪細胞の分化マーカーである FABP4 や PPAR γ の発現上昇がみられること、及びマウスの骨芽細胞と PC-3 細胞の接触培養によって骨芽細胞の ALP 活性が低下することが明らかになった。以上より、成熟骨芽細胞と前立腺癌細胞の接触により骨芽細胞の分化抑制が起こる可能性が示唆された。成熟骨芽細胞骨は骨基質形成に重要な役割を果たすが、前立腺癌細胞はその機能を低下させ、骨を脆弱化することにより浸潤を容易にしている可能性がある。

研究分野：癌の転移

キーワード：骨転移、細胞接触、網羅的遺伝子発現解析

1. 研究開始当初の背景

癌の骨転移は重篤な臨床症状を惹起し患者の QOL を低下させる重要な病態である。しかし、そのメカニズムの解明や治療法の確立は十分なされていない。申請者はこれまでにヒト前立腺癌細胞株をヌードマウスの脛骨に接種するモデルを用いて骨転移形成において platelet-derived growth factor (PDGF) 受容体や epidermal growth factor (EGF) 受容体が関与していること (J Natl Cancer Inst. 2003 95(6): 458-470, Clin Cancer Res. 2003 9(14):5161-5170)、および可溶性プロスタグランジン E₂ 受容体を用いてプロスタグランジン E₂ を中和することにより、破骨細胞の誘導が阻害され、骨における前立腺癌細胞の増殖が抑制されること (Mol Cancer Ther. 7(9): 2807-16, 2008) を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

骨芽細胞は骨に転移した癌細胞の増殖や生存に重要な役割を果たしている。癌細胞と骨芽細胞の相互作用に関しては多くの報告があるが、大部分は両者が分泌する液性因子を介したものであり、癌細胞と骨芽細胞が直

接接触することによって起きる相互作用に関しては不明な点が多い。

我々は昨年度の金沢大学腫瘍内科矢野聖二教授との共同研究において、前立腺癌、肺癌、乳癌などの細胞株を用いて癌細胞と骨芽細胞の直接接触による相互作用を検索するための共培養モデルを確立し、癌細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析した。その結果、PC3 ヒト前立腺癌細胞では骨芽細胞と接触することによって IL-1 β , COX-2, IL-6 など代表的な破骨細胞誘導関連遺伝子の発現が上昇し、これに cadherin-11 が部分的に関与していることが明らかになった。

本研究では上記の共培養モデルを用いて癌細胞との接触による骨芽細胞の遺伝子発現の変動を cDNA マイクロアレイによって解析し、骨での癌細胞の増殖、生存への関与とその機序を明らかにすることを目的とし、これによって骨転移に対する新しい分子標的治療の開発に貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

1) cDNA マイクロアレイを用いた癌細胞との接触による骨芽細胞の遺伝子発現の網羅的

解析

不死化したヒト骨芽細胞(hFOB 1.19)と骨転移巣から樹立されたヒト前立腺癌細胞株 PC-3 を用い、それぞれの細胞を異なる蛍光色素でラベルした後、cell culture insert を用いた癌細胞と骨芽細胞の二層培養(癌細胞と骨芽細胞の相互作用が液性因子のみ)、および癌細胞と骨芽細胞を混合して培養する接触培養(癌細胞と骨芽細胞の相互作用が液性因子と直接接触の2つ)を行った。培養は無血清状態で48時間行い、接触培養については培養終了後にソーティングを行い、骨芽細胞と癌細胞を分離した。コントロールとして単独で培養した骨芽細胞を用いた。

培養終了後に得られた骨芽細胞から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ(Affimetrix 社)を行った。遺伝子発現が3倍以上異なるものを有意とした。アレイの結果は RT-PCR で確認した。

2) 癌細胞との接触が骨芽細胞の分化に及ぼす影響

マウス新生児の頭蓋骨から得られた骨芽細胞を骨芽細胞分化培地で7日間培養し、1)と同様の方法で PC-3 細胞と共培養を行った。

培養終了後に得られた骨芽細胞のライセートを用いて alkaline phosphatase (ALP) 活性を測定した。

3) Fatty acid binding protein 4 (FABP4) が破骨細胞の骨吸収活性に及ぼす影響

今回行ったマイクロアレイにおいて二層培養と比較して接触培養で最も高い発現上昇率を示したのは FABP4 であった。そこで FABP4 が破骨細胞の骨吸収活性に及ぼす影響について検討した。

実験には PG リサーチ社の骨吸収活性評価キットを用いた。まず、RANKL により破骨細胞に分化することが知られているマウスマクロファージ細胞株 RAW264 を蛍光標識リン酸化カルシウム固着プレートに播種し、培地に RANKL (100ng/ml) と FABP4 (0, 1, 10, 100ng/ml) を添加した。7日後に骨吸収作用により培地中に溶出した蛍光を測定した。

4. 研究成果

1) ヒト前立腺癌細胞 PC-3 とヒト骨芽細胞(hFOB 1.19)を用いて二層培養、および接触培養を行い、単独で培養した骨芽細胞をコントロールとした。それぞれの培養システムにおける骨芽細胞の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイを用いて比較したところ、単独培養と二層培養間で有意な差は認められなかったが、二層培養と接触培養間では、接触培養で発現が上昇している遺伝子が12個あった。一方有意に発現が低下している遺伝子はなかった。最も高い発現上昇を示したのは分化した脂肪細胞に高発現することが知られ

ている FABP4 で 5.02 倍であった。抗 FABP4 抗体を用いてヌードマウス脛骨への PC-3 細胞移植モデルにおける FABP4 発現を検索すると、正常部の骨芽細胞と比べて腫瘍に接する部分の骨芽細胞で FABP4 の発現が高いことがわかった。

2) マイクロアレイでは、FABP4 と同様に脂肪細胞に高発現している PPAR- γ も 2.5 倍と発現が上昇していた。骨芽細胞は骨髄間質幹細胞由来だが、この細胞は骨芽細胞や脂肪細胞への多分化能を有しており、骨芽細胞が分化誘導によって脂肪細胞に変わることが報告されている。われわれは今回の結果から骨芽細胞と前立腺癌細胞の接触が骨芽細胞の分化に影響を及ぼすのではないかと考え、マウス新生児の頭蓋骨から得られた骨芽細胞と PC-3 細胞との共培養を行った。その結果、骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性は単独培養と二層培養間で有意な差は認められなかったが、二層培養と接触培養間では、接触培養で有意に低下することが分かった。

3) FABP4 存在下での骨吸収活性を調べたところ、有意差はなかったが、FABP4 の用量に依存して骨吸収活性が上昇傾向を示した。FABP4 の細胞外での働きについてはほとんどわかっていないが、以前の検討で骨芽細胞との接触培養により前立腺癌細胞においても FABP4 発現が上昇することがわかっており、FABP4 が骨吸収に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆されるが、これについてはさらなる検討を要する。

以上より、成熟骨芽細胞と前立腺癌細胞の接触により骨芽細胞の分化抑制が起こる可能性が示唆された。成熟骨芽細胞骨は骨基質形成に重要な役割を果たすが、前立腺癌細胞はその機能を低下させ、骨を脆弱化することにより浸潤を容易にしている可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Shiirevnyamba A, Takahashi T, Shan H, Ogawa H, Yano S, Kanayama H, Izumi K, Uehara H. Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. Br J Cancer. 2011 Feb 1;104(3):505-13.

〔学会発表〕(計1件)

Hongchao Shan, 上原 久典、泉 啓介
Osteoblast differentiation is interrrered by direct contact with osteolytic prostate cancer cells 第19回日本がん転移学会学術総会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部・
准教授 上原 久典

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

腫瘍内科・教授 矢野 聖二